

[print](#) | [export](#)**DE3147763A1 -  
Available Text for  
Patent Family****DE3147763 A1**

**Publication number:** DE3147763 A1

**Publication country:** GERMANY

**Publication type:** DOCUMENT LAID OPEN (FIRST PUBLICATION)

**Publication date:** 19830609

**Application number:** DE19813147763

**Application date:** 19811202

**Priority:** DE19813147763 19811202 ;

**Assignee<sup>std</sup>:** STICKL HELMUT PROF DR MED ;

**Inventor<sup>std</sup>:** LENK OSTENDORF ANDREAS ;  
STICKL HELMUT PROF DR MED ;

**International class<sup>1-7</sup>:** G01N33/54 ;

**International class<sup>8</sup>:** C12Q1/34 20060101 I C ; C12Q1/34 20060101 I A ;

**European class:** C12Q1/34 ;

**Title:** Detection methods for the in vitro determination of the allergen corresponding with an allergy  
NACHWEISVERFAHREN ZUR IN VITRO-BESTIMMUNG DES BEI EINER ALLERGIE KORRESPONDIERENDEN ALLERGENS

**Abstract:** The invention relates to detection methods for the in vitro determination of the allergen corresponding with an allergy, which is carried out by first making the blood sample taken from an individual incoagulable, then allowing different layers to form, and using the supernatant, i.e. the serum layer with the white blood corpuscles, for the detection, which is characterised in that a small amount of the supernatant is mixed with a small amount of a solution of the test allergen to be tested, the vessel is closed, the sample is left to incubate for an adequate time and is subsequently centrifuged, about 0.1 ml is removed, and the release products of the cell are measured and compared with a control.

**Claims:** Patent ansprueche 1.  
Nachweisverfahren zur in vitro-Bestimmung des bei einer Allergie korrespondierenden Allergens, zu dessen Durchfuehrung man die einem Individuum entnommene Blutprobe

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑪ DE 31 47 763 A 1

⑤ Int. Cl. 3:  
G 01 N 33/54

②① Aktenzeichen:  
②② Anmeldetag:  
④③ Offenlegungstag:

P 31 47 763.1.  
2. 12. 81  
9. 6. 83

⑦① Anmelder:  
Stickl, Helmut, Prof.Dr.med., 8033 Krailling, DE

⑦② Erfinder:  
Stickl, Helmut, Prof. Dr.med., 8033 Krailling, DE;  
Lenk-Ostendorf, Andreas, 8000 München, DE

DE 31 47 763 A 1

Erfindereigentum

⑥④ Nachweisverfahren zur in Vitro-Bestimmung des bei einer Allergie korrespondierenden Allergens

Die Erfindung betrifft Nachweisverfahren zur in vitro-Bestimmung des bei einer Allergie korrespondierenden Allergens, zu dessen Durchführung man die bei einem Individuum entnommene Blutprobe zuerst ungerinnbar macht, dann verschiedene Schichten sich ausbilden läßt, und den Überstand, d.h. die Serumschicht mit den weißen Blutkörperchen zum Nachweis verwendet, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine geringe Menge des Überstandes mit einer geringen Menge einer Lösung des zu prüfenden Test-Allergens versetzt, das Gefäß verschließt, die Probe eine ausreichende Zeit inkubieren läßt, anschließend zentrifugiert, etwa 0,1 ml entnimmt, die Freisetzungserzeugnisse der Zelle mißt und sie mit einer Kontrolle vergleicht.

(31 47 763)

DE 3147763 A 1

3147763

DR. BERG    DIPL.-JNG. STAPF  
DIPL.-JNG. SCHWABE    DR. DR. SANDMAIR  
PATENTANWÄLTE  
Postfach 860245 · 8000 München 86

Anwaltsakte 31 749

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Nachweisverfahren zur in vitro-Bestimmung des bei einer Allergie korrespondierenden Allergens, zu dessen Durchführung man die einem Individuum entnommene Blutprobe zuerst ungerinnbar macht, dann verschiedene Schichten sich ausbilden läßt und den Überstand, d.h. die Serumschicht mit den weißen Blutkörperchen zum Nachweis verwendet, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man eine geringe Menge, vorzugsweise 0,1 ml des Überstandes mit einer geringen Menge, vorzugsweise etwa 0,2 ml einer Lösung des zu prüfenden Test-Allergens versetzt, das Gefäß verschließt, die Probe eine ausreichende Zeit inkubieren läßt, anschließend vorzugsweise zentrifugiert, etwa 0,1 ml entnimmt und die Freisetzungsprodukte der Zelle mißt und sie mit einer Kontrolle vergleicht.

2. Nachweisverfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man zum Nachweis der aus der Zelle freigesetzten Proteasen oder Peptidasen eine

V/st

- 2 -

☎ (089) 98 8272  
98 8273  
98 8274  
98 3310

Telegramme:  
BERGSTAPFPATENT München  
TELEX:  
0524560 BERG d

Bankkonten: Hypo-Bank München 441012850  
(BLZ 70020011) Swift Code: HYPO DE MM  
Bayer. Vereinsbank München 453100 (BLZ 70020270)  
Postscheck München 65343-808 (BLZ 70010080)

- 2 -

geringe Menge, vorzugsweise 0,1 - 0,5 ml des Zentrifugat-  
überstandes mit vorzugsweise 3 ml einer 0,1 molaren  
Pufferlösung, die auf einen schwach sauren pH eingestellt  
ist und einen durch Proteasen oder Peptidasen spaltbaren  
Indikator enthält, versetzt und die erhaltene, mit Über-  
stand und Indikator gut durchmischte Pufferlösung in eine  
Meßküvette eingibt, die durch die Indikatorspaltprodukte  
verursachte Extinktionsänderung pro Zeiteinheit photometrisch  
mißt und mit einer Kontrollprobe ohne das zu prüfende Test-  
Allergen vergleicht.

3. Nachweisverfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t , daß man zum Nachweis der  
aus der Zelle freigesetzten alkalischen Phosphatase eine  
geringe Menge, vorzugsweise 0,05 ml des Zentrifugatüber-  
standes mit vorzugsweise 3 ml einer alkalischen Pufferlösung,  
die einen durch alkalische Phosphatase spaltbaren Indikator  
enthält, versetzt und die erhaltene, mit Überstand und  
Indikator gut durchmischte Pufferlösung in eine Meßküvette  
eingibt, etwa während 3 bis 5 min. die Extinktionsänderung  
photometrisch mißt und mit einer Kontrollprobe ohne das  
zu prüfende Test-Allergen vergleicht.

4. Nachweisverfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t , daß man zum Nachweis gerin-  
nungshemmender Spaltprodukte, vor allem des Heparins, eine

- 3 -

geringe Menge, vorzugsweise etwa 0,05 ml menschliches Blut durch Natriumcitrat ungerinnbar macht, die Zeit der Gerinnungshemmung durch die genannten Substanzen dadurch mißt, daß die durch Natriumcitrat bewirkte Gerinnungshemmung durch Zusatz eines Überschusses an Calciumionen rückgängig gemacht wird und die durch die gerinnungshemmenden Spaltprodukte bewirkte Gerinnungshemmung dadurch gemessen wird, daß man die Zeit bis zum ersten Auftreten eines Gerinsels mißt und mit einer Kontrollprobe ohne das zu prüfende Test-Allergen vergleicht.

5. Verfahren nach Anspruch 1 und Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man zum Nachweis von Proteasen als Indikatoren l-Leucin-p-nitroanilid, l-Leucin- $\beta$ -naphthylamid, Leucin-hydrazin, l-Leucin-amid, l-Leucylglycin, l-Leucylalanin, Haemoglobin, Serumproteine, Rinderalbumin, Casein, Sulfanilamidcasein, Edestin, radioaktiv markiertes Albumin und Haemoglobin verwendet und jeweils bei entsprechender Wellenlänge photometrisch mißt.

6. Nachweisverfahren nach Anspruch 1 und 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man zum Nachweis von Phosphatase Phenolphthalein-monophosphat, Phenolphthalein-diphosphat, 4-Nitrophenylphosphat, p-Nitrophenylphosphat, 2,6-Dibromchinonchloridphosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat,  $\beta$ -Naphthylphosphat, Phenolphosphat, Phosphorsäureester von Flurescin, Eosin, 4-Methol-7-oxy-cumarin und 3-Hydroxy-2-naphth-anilid und 4-Methylbelliferylphosphat als Indikator verwendet

und jeweils bei entsprechender Wellenlänge die freigesetzten Spaltprodukte photometrisch mißt.

7. Nachweisverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine geringe Menge, vorzugsweise 0,05 ml des Überstandes mit einer geringen Menge, vorzugsweise 0,1 ml einer isotonen Penicillinlösung ( $10^4 - 10^7$  JE/ml) und gleichzeitig mit einer geringen Menge, vorzugsweise 0,05 ml einer isotonen 4 - 40 millimolaren Phenolphthaleinmonophosphatlösung versetzt, 1/4 bis 2 h inkubiert, mit Alkali, vorzugsweise einer Mischung aus Diäthanolamin und Alkohol auf einen pH von etwa 10 - 12 einstellt und die Extinktion nach etwa 15 min. photometrisch bestimmt.

3147763

DR. BERG DIPL.-ING. STAPF  
DIPL.-ING. SCHWABE DR. DR. SANDMAIR  
PATENTANWÄLTE

Postfach 860245 · 8000 München 86

-5-

Anwaltsakte 31 749

Professor Dr. med. Helmut Stickl  
8033 Krailling b. München

---

NACHWEISVERFAHREN ZUR IN VITRO-BESTIMMUNG DES BEI  
EINER ALLERGIE KORRESPONDIERENDEN ALLERGENS.

---

V/st

☎ (089) 98 8272  
98 8273  
98 8274  
98 3310

Telegramme:  
BERGSTAPFPATENT München  
TELEX:  
0524 560 BERG d

Bankkonten: Hypo-Bank München 441012850  
(BLZ 70020011) Swift Code: HYPO DE MM  
Bayer Vereinsbank München 453100 (BLZ 70020270)  
Postscheck München 65343-808 (BLZ 70010080)

In den vergangenen Jahrzehnten haben allergische Erkrankungen allgemein sehr zugenommen. Eine Allergie bedeutet, daß der gesamte menschliche Organismus auf bestimmte Substanzen, die mit ihm zusammenkommen, in außergewöhnlicher Art und Weise reagiert. Es können hierbei Allergien vom Soforttyp, vom Arthus-Typ, Kontaktallergien und Allergien vom verzögerten Typ unterschieden werden (Allergien I bis IV nach Coombs).

Für die Bestimmung der für Allergien kausativen Allergene gibt es unterschiedliche Nachweismethoden, wie beispielsweise die Intrakutanteste und Epikutanteste, bei denen das korrespondierende Allergen in die Haut eingebracht wird. Diese Tests belasten den Patienten und können ihn sogar gefährden.

Es gibt ferner Labormethoden, die jedoch den Nachteil haben, daß sie umständlich und teuer sind und daß vielfach radioaktives Material zur Ablesung verwendet werden muß.

Es fehlt jedoch bislang noch immer ein Nachweisverfahren, das es gestattet, ein weites Feld von Allergenen außerhalb des Körpers zu erfassen, ohne das Individuum durch mehr als eine Blutentnahme zu belasten und es durch Schockgefährliche Allergene zu gefährden. Ein solches Nachweisverfahren soll einfach durchzuführen und möglichst ohne Verwendung radioaktiver Substanzen ablesbar sein.



Alle vier Allergie-Typen haben eines gemeinsam, nämlich die Reaktion jeder Zelle bzw. Zelloberfläche des gesamten Organismus auf ein Allergen. Kommen besonders Lymphocyten eines Spenders, der an einer allergischen Erkrankung leidet, mit dem der Allergie korrespondierenden Allergen zusammen, so war es bekannt, daß sich zuerst die elektronegative Oberflächenladung der Zelle erniedrigt und es dann sehr schnell zu einer Transmineralisation von Kaliumionen und Natriumionen kommt, was mit der Veränderung der Oberflächenladung der Zelle zusammenhängt.

Es wurde nunmehr überraschend gefunden, daß die Zellen eines Allergikers bestimmte Substanzen, vor allem Enzyme und Heparin freisetzen, wenn sie mit dem korrespondierenden Allergen in Kontakt gebracht werden. Während bisher lediglich bekannt war, daß hierbei Histamin und andere allergische Mediatorsubstanzen zu Körperreaktionen führen können, wurde nunmehr gefunden, daß in einem geschlossenen System durch Zugabe bestimmter Indikatoren eine Allergie bzw. das die Allergie erzeugende Allergen als Ursache der Allergie erkannt werden kann. Das erfolgt durch die Spaltung zugesetzter Indikatoren durch aus der Zelle freigesetzte Enzyme oder durch die Gerinnungshemmung von Blut als Indikatorsystem für freigesetzte Gerinnungshemmsubstanzen wie z.B. Heparin (im folgenden Gerinnungshemmfaktor genannt).

Der vorliegenden Erfindung liegt demnach folgendes Prinzip zugrunde:

Isolierte Zellen des peripheren Blutes verändern sich, wenn sie von einem Allergiker stammen und mit demjenigen Allergen, durch das der Allergiker krank wird, in vitro in Kontakt gebracht werden: Die Zelloberfläche wird undicht und es werden bei den Allergie-Typen I bis IV bestimmte Substanzen in die Umgebung abgegeben, die ihrerseits bestimmte zugesetzte Indikatoren spalten, deren Spaltprodukte gemessen werden können.

Bei den aus der Zelle freigesetzten und für den vorliegenden Nachweis verwendbaren Substanzen handelt es sich vor allem um Proteasen sowie um Phosphatase und Gerinnungshemmstoffe.

Das Freiwerden von Proteasen aus der Zelle läßt sich mit einem geeigneten Indikator feststellen, dessen Spaltprodukte dann photometrisch mit einer Farbreaktion gemessen werden können. Ungeeignet als Indikatoren sind solche Substanzen, gegen die der Patient allergisch ist. Geeignete Indikatoren hierfür sind beispielsweise:

l-Leucin-p-nitroanilid, l-Leucin- $\beta$ -naphthylamid, Leucinhydrazin, l-Leucinamid, l-Leucylglycin, l-Leucylalanin, Haemoglobin, Serumproteine, Rinderalbumin, Casein, Sulf-

anililamidcasein, Edestin, radioaktiv markiertes Albumin und Haemoglobin. Bevorzugt wird l-Leucin-p-nitranilid.

Die Freisetzung von Proteasen als Erkennungszeichen einer Allergie läßt sich dort nutzbar machen, wo Allergene verwendet werden, die selbst nicht durch Proteasen zerstört werden und die selbst keine Fermenthemmer sind. Allergene, die aus sehr enzymanfälligen, labilen Proteinen bestehen, z.B. einige Virusproteine und durch diese Proteasen selbst zerstört werden, können daher in dem erfingungsgemäßen Proteasen-Freisetzungstest nicht eingesetzt werden.

Das Freiwerden von Phosphatase aus dem Zellinnern läßt sich mit solchen Substanzen als hierfür geeignete Indikatoren feststellen, die durch Phosphatase gespalten werden und deren Spaltprodukte sich photometrisch nachweisen lassen. Beispiele hierfür sind:

Phenolphthalein-monophosphat, Phenolphthalein-di-phosphat, p-Nitrophenylphosphat, 2,6-Dibromchinochloridphosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, 8-Naphthylphosphat, Phenylphosphate (besonders für die saure Phosphatase), Phosphorsäureester von Florescin, Eosin, 4-Methol-7-oxy-cumarin und 3-Hydroxy-2-naphthanilid, weiter 4-Methylumbelliferyl-phosphat. Bevorzugt wird hierfür Phenolphthalein-monophosphat verwendet. Auch hier sind wiederum Substanzen ungeeignet, gegen die

der Patient allergisch ist.

Im Phosphatase-Freisetzungstest können keine Allergene verwendet werden, die selbst Phosphatase enthalten, weil diese den Test verfälschen würden. So enthalten z.B. Rohpollen-Suspensionen bzw. deren Rohextrakte selbst Phosphatase. Die Phosphatase hat den Vorteil, daß sie hitzestabil ist, daß dieser Test relativ robust ist und außerdem nicht durch Fermentgifte gehemmt wird. So können hiermit beispielsweise Antibiotika-Allergien nachgewiesen werden.

Neben den obengenannten Enzymen gibt die Zelle - und hierzu gehören in erster Linie Makrophagen und große Lymphocyten - Gerinnungshemmstoffe wie z.B. Heparin, frei. Als Indikatorsystem für den Nachweis dieser Hemmfaktoren dient die Verzögerung der Gerinnungszeit von Blut.

Im Gerinnungstest können keine Allergene verwendet werden, die selbst gerinnungshemmend wirken. So ist z.B. im Gerinnungshemmtest kein Bienengift als Test-Allergen anwendbar, da Bienengift selbst, das ein sehr starkes Allergen sein kann, die Gerinnung hemmt. Gleiches gilt für bestimmte Insektengifte und für Schlangengifte, wie sie als Bestandteile in einigen Arzneimitteln enthalten sind. Ebenso lassen sich keine Allergene verwenden, die selbst Eiweißfällungsmittel sind, da hierdurch ein Gerinnungsvorgang vorgetäuscht wird;

Eiweißfällungsmittel sind beispielsweise Quecksilberverbindungen.

Damit freigesetzte Gerinnungshemmstoffe nachgewiesen werden können, muß das Blut durch Zusatz von Natriumcitrat ungerinnbar gemacht werden. In dieser Phase können die Zellen mit dem Allergen reagieren, wodurch zelleigene Gerinnungshemmstoffe freigesetzt werden. Die Zeit der Gerinnungshemmung wird dadurch gemessen, daß die Gerinnungshemmung durch Natriumcitrat durch Zusatz eines Überschusses an Calciumionen (Fällung) rückgängig gemacht wird. Die jetzt sichtbare Gerinnungshemmung geht nur noch auf zelleigene Hemmstoffe zurück.

Eine praktische Art der Durchführung dieser Bestimmungsmethode ist folgende:

- (1) Blut des Patienten wird mit Natriumcitrat ungerinnbar gemacht.
- (2) Durch Zusatz des Allergens werden aus den Leukozyten Gerinnungshemmstoffe freigesetzt.
- (3) Das gleiche Blut wird durch Zusatz eines Überschusses von Calciumionen, vorzugsweise Calciumglukonat oder  $\text{CaCl}_2$ , und Inaktivierung des Natriumcitrates wieder gerinnbar

gemacht, so daß sich jetzt nur noch die Gerinnungshemmung durch diese Faktoren auswirkt. Die Bildung von Fibrinfäden (Blutgerinnung) wird sichtbar, wenn in kurzzeitigen Abständen Glaskapillaren durch das Blut hindurchgezogen werden.

Normalerweise kommt es beim Blut eines Gesunden bzw. bei einem Nichtallergiker ohne Zusatz eines Allergens innerhalb von 3-4 Minuten zur Blutgerinnung, d.h. zur Ausfällung von Fibrinfäden im Blut. Wurden jedoch durch Wirkung des Allergens aus den Leucozyten Gerinnungshemmstoffe freigesetzt, so kann diese Blutgerinnung bis zu 28 min. verzögert werden. Dieser Vorgang läßt sich sehr leicht auf folgende Weise verfolgen und messen:

Solange das Blut noch nicht geronnen ist, schreibt die Glasnadel durch das Blut hindurch; bei beginnender Blutgerinnung lagern sich die Fibrinfäden um die Glasnadel und nehmen den Blutkuchen, der sich inzwischen gebildet hat, mit.

Zusammenfassend ergibt sich somit, daß durch ein Allergen aus den weißen Blutkörperchen in jedem Falle bestimmte Substanzen freigesetzt werden, Fermente und Gerinnungshemmstoffe; die Fermente lassen sich mit entsprechenden Indikatoren, mit denen man Farbreaktionen erzeugen kann, nachweisen, bei gerinnungshemmenden Zellsubstanzen wie z.B.

Heparin, wird das Gerinnungssystem des Blutes als Indikator verwendet.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren wird für freigesetzte Fermente, beispielsweise auf die Weise durchgeführt, daß vom Patienten 4 bis 12 cm<sup>3</sup> Blut abgenommen werden, das auf bekannte Weise z.B. durch Citratzusatz ungerinnbar gemacht und 1 Stunde, z.B. in langen Senkungsröhrchen, ruhig stehen gelassen wird; hierdurch setzen sich die Blutbestandteile in verschiedenen Schichten ab. Die Schicht mit den roten Blutkörperchen wird verworfen. Die Plasmaschicht mit den weißen Blutkörperchen wird für die weitere Untersuchung verwendet, wobei einzelne untergemischte Erythrozyten nicht stören.

Die Plasmaschicht wird auf die Versuchsansätze verteilt. Hinzu werden die Indikatorlösung und das zu testende Allergen zugesetzt. Einem Vergleichsansatz (Kontrolle) wird kein Allergen beigegeben. Dieser Vergleichsansatz soll Auskunft über die Fermentfreigabe nicht Allergen-provozierter Leukozyten geben und dient beim späteren photometrischen Vergleich als Nullwert. Alle Allergenansätze und der Ansatz ohne Allergen werden in gleicher Zusammensetzung doppelt angelegt und jeweils einer davon sofort, eventuell nach Zugabe von Ableselösungen, photometrisch ausgewertet. Dies dient zur Bestimmung des Leerwertes ( $E_0$ ). Die restlichen Ansätze läßt man eine halbe bis drei Stunden reagieren,

der normierten Verhältnisse wegen am besten luftdicht verpackt im Brutschrank.

Für jede einzelne Allergiebestimmung werden ein geringe Menge, d.h. 0,1 bis 0,2 ml Plasma mit dem zu prüfenden Allergen vermischt. Die Menge des zu prüfenden Allergens steht mit der Temperatur sowie der Zeitdauer der Inkubation in Beziehung. So wird z.B. bei dreistündiger Inkubation (37°C) im Falle einer Neuroallergie bereits mit 10-20 µg encephalitogenem Protein eine Allergiereaktion nachgewiesen. Bei Penicillin sind 1 mg Penicillin G pro ml Plasma ausreichend. Bei korpuskularen Antigenen, z.B. Pollen, geht man von 1-10 mg/ml Plasma aus. Bei proteinhaltigen Pollenextrakten von 60-200 mg/ml Plasma. Verringert man die Temperatur auf +10° bis +15°C, so muß eine Inkubationszeit von 8 bis 10 h gewährleistet sein, ehe sich spezifische Unterschiede zwischen dem Vergleichs- und dem Prüfungsansatz abzeichnen. Dabei ist darauf zu achten, daß die Ansätze nicht ausflocken (feuchte Kammer), weil sonst hypertone Lösungsbedingungen entstehen, die die Freigabe von Fermenten behindern.

Bei der photometrischen Auswertung findet ein einfaches Eppendorf-Photometer Verwendung. Vergleichsansätze (Kontrollen) werden in ihrer Extinktion mit den Versuchsansätzen verglichen.

Bei der Phosphatasereaktion, bei der Phenolphthalein frei-



gesetzt wird, gibt man auf bekannte Weise Alkali im Überschuß zu. Hierdurch kommt es zu einer Rotfärbung des Phenolphthaleins. Diese Rotfärbung des Phenolphthaleins wird photometrisch vorzugsweise im Grünbereich des Photometers bei 550 bis 555 nm gemessen.

Wenn die von der Zelle freigesetzten Proteasen mit den Indikatoren reagiert haben, können diese Reaktionsprodukte bei entsprechender Wellenlänge direkt photometrisch gemessen werden. Auch hier erfolgt die Messung im Grünbereich des Photometers, und die photometrische Extinktion der Prüfansätze wird mit dem Kontrollansatz verglichen.

Für alle Allergene sollten die optimalen Konzentrationen im Test ermittelt werden.

Bei allen drei Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens (Protease-Test, Phosphatase-Test und Gerinnungshemmtest) sollte der Patient in seinem Blut nicht weniger als 3.000 und nicht mehr als 10.000 Leukozyten haben. In diesem Bereich ergibt der Prüfansatz zum Vergleichsansatz auswertbare und testspezifische Unterschiede.

Beispiele für auszutestende Allergien sind diejenigen auf Pollen von Gräsern, Bäumen und Blüten. Test-Allergene stehen in hoher Reinheit als proteinhaltige Extrakte der genannten Pollen im Handel zur Verfügung. Bei dieser Bestimmung

kann der Protease-Test sowie der Gerinnungstest eingesetzt werden, Pollenextrakte enthalten Phosphatase, weshalb der Phosphatase-Test verfälscht.

Große klinische Bedeutung besitzen Allergien auf verschiedene Antibiotika. Bei der häufigsten Antibiotika-Allergie, der Penicillin-Allergie, sind alle drei Testsysteme geeignet. Bei der Allergie gegen Tetracycline sollte jedoch der Gerinnungstest nicht verwendet werden, da Tetracycline selbst Calcium fällen und damit beim Zusatz von Calciumüberschuß zum System eventuelle Verfälschungen eintreten können. Bei der Ermittlung von Antibiotika-Allergien, die einen schnelleren zeitlichen Ablauf bei entsprechender Konzentration und Einhaltung der Temperatur von 37°C im Inkubator aufweisen, kann der Gerinnungstest, der einfach und arbeitssparend ist, als Suchtest angewendet werden, wenn die Auswertung auf viele Antibiotika- bzw. Stoffgruppen angesetzt wird.

Weitere Bedeutung haben für das allergische Asthma Allergien auf bakterielle Spaltprodukte. Diese sind leicht zu isolieren. Sie enthalten jedoch Proteasen. Aus diesem Grunde ist der Protease-Test für die Ermittlung einer bakteriellen Allergie beim Asthma weniger gut geeignet als der Gerinnungs- und der Phosphatase-Test.

Weitere große Bedeutung haben bestimmte Nahrungsmittel-

Allergien, wie z.B. Allergien auf bestimmte Proteine von Krustentieren. Entsprechende Allergen-Lösungen sind im Handel erhältlich. Mit diesen Allergen-Lösungen kann am besten der Phosphatase-Test oder der Gerinnungstest durchgeführt werden. Da bei diesen proteinhaltigen Allergen-Lösungen die Freisetzung von Proteasen aus den Zellen zur Zerstörung des Allergens und damit zur Limitierung des Tests führen könnte, sollte der Proteasetest in diesen speziellen Fällen nicht zur Anwendung kommen. Gleiches gilt, wenn eine Allergie auf heterologe Eiweißstoffe, beispielsweise gegen Kuhprotein (Kuhmilch-Allergie) vorgenommen werden soll. Bei der ebenfalls nicht seltenen Formol-Allergie können entsprechende Verdünnungen dieser Lösungen den Leukozyten direkt zugesetzt werden. Eine Allergie gegen diese Substanz läßt sich mit allen drei Testvarianten ermitteln.

Der Gerinnungshemmtest als weitere Verfahrensvariante eignet sich zur Ermittlung sämtlicher Allergien mit Ausnahme derjenigen, in denen das Allergen selbst die Gerinnungsfähigkeit des Blutes beeinflußt. Hierzu gehören gerinnungshemmende Substanzen, wie z.B. proteolytische und fibrinolytische Enzyme (z.B. Schlangengifte, wie sie in Salben und Medikamenten zur Behandlung von Thrombosen enthalten sind), heparinhaltige Medikamente und Calciumfällungsmittel. Der Gerinnungstest eignet sich zur Ermittlung von Pollen-Allergien, zur Ermittlung einiger Kontaktallergien, wie z.B. die Chrom-

allergie, die Nickelallergie, die Allergie gegen Silber, Bleisalze und Gold.

Zur Ermittlung der geeigneten Verfahrensvariante: Werden bei einer Allergie mehrere Allergene als Ursache verdächtigt, so muß zuerst festgestellt werden, welche der genannten Test-Varianten die günstigste ist, um das verantwortliche Allergen zu ermitteln.

Die primär günstigste Test-Variante ist der Gerinnungshemmtest:

Er erfaßt praktisch alle Allergene, mit Ausnahme derjenigen, die das Gerinnungssystem selbst direkt beeinflussen. Hierzu gehören Arzneimittel, die selbst gerinnungshemmend wirken. Alle anderen Allergene (z.B. Blütenpollen, Eiweißextrakte, Antibiotika, Hausstaub-Milben, u.a.) lassen sich mit diesem Test ermitteln. Als nächster, robuster Test mit guter Reproduzierfähigkeit ist der Phosphatase-Test anzusehen. Hier können mit Ausnahme der Blütenpollen, die selbst Phosphatase enthalten, praktisch alle übrigen Allergene gemessen werden. Der Protease-Test steht dann immer noch als Kontrolltest und als Test für bestimmte, besondere Aufgaben zur Verfügung.

Beispiel 1: Bestimmung der freigesetzten Proteasen

Man entnimmt einem Individuum eine Blutprobe und versetzt diese mit Heparin zur Gerinnungshemmung. Nachdem diese Probe eine bis eineinhalb Stunden bei Zimmertemperatur oder bei 37°C im Brutschrank ruhig gestanden hat, kann man eine ausreichende Menge an in Plasma suspendierten Leukozyten im Überstand abheben.

Eine geringe Menge, d.h. 0,1 bis 0,2 ml Plasma (Überstand) und 0,2 ml isotoner Allergenlösung, z.B. Bakterienlysat, Virus, Antibiotikallösungen usw. werden in ein Reagensglas gegeben, dieses wird luftdicht verschlossen und während vier Stunden in einem 37°C-warmen Brutschrank gestellt. Danach schüttelt man die Probe auf, zentrifugiert und entnimmt 0,1 ml des Überstandes und gibt diesen in drei ml einer 0,1 molaren Phosphatpufferlösung, die auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt ist und Leucin-p-nitroanilid in einer Konzentration von 0,7 mM/l enthält. Anstelle des Leucin-p-nitroanilids kann auch jedes andere Substrat, das von mehr oder weniger unspezifischen Proteasen oder Peptidasen gespalten wird, und dessen Spaltprodukte photometrisch erfaßbar sind, für diesen Zweck verwendet werden.

Anschließend wird der in der Pufferlösung aufgenommene Indikator (0,05 ml) und dem vom Patienten stammenden Probeanteil (0,05 ml) mit dem Allergen (0,1 ml) durchgemischt

und ein ausreichender Teil hiervon in eine Meßküvette gegeben, 3 - 4 h inkubiert und im Falle des Leucin-p-nitroanilids die Extinktion bei 405 nm Lichtwellenlänge bei 25°C bestimmt.

Besteht eine Allergie gegen das Test-Allergen, so ist die Aktivität, gemessen gegenüber der Differenz der Kontrollprobe ohne Test-Allergen erhöht.

Mit der vorstehend beschriebenen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens können z.B. Antibiotika-Allergien, Infektions-Allergien, Blütenpollen-Allergien, Bienengift- und Wespengift-Allergien erkannt werden.

Beispiel 2: Bestimmung der freigesetzten alkalischen Phosphatase

Der Versuchsaufbau ist bis zu dem 3- bis 4-stündigem Inkubieren mit dem des Beispiels 1 identisch.

Es werden 0,2 ml des Überstandes entnommen und in 0,6 ml einer 1-molaren Diäthanolamin-Pufferlösung (pH 9,0 - 12,0) eingegeben. Es sind auch alle anderen Phosphatasesubstrate geeignet, deren Spaltung photometrisch erfaßbar ist, wie z.B. Monophosphophenolphthalein. Die Extinktion wird bei 555 nm Lichtwellenlänge gemessen (Ependorf-Photometer; Filter Hg).

Besteht eine Allergie gegen das verwendete Test-Allergen, so ist die Extinktion gegenüber dem Kontrollansatz erhöht.

Das Verfahren des Beispiels 2 ist ungeeignet für Allergene mit hohen Aktivitäten an Phosphatase, sowie Patienten mit hohen Serumaktivitäten an alkalischer Phosphatase.

Diese Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens eignet sich zur Ermittlung von Allergien, die durch proteinhaltige Allergene hervorgerufen werden, wie z.B. Fischeiweiß, Krebseiweiß, Kuhprotein (Milchallergie) sowie zur Ermittlung von Antibiotika-Allergien, Bienengift- und Wespengift-Allergien. Lediglich der Heuschnupfen eignet sich nicht zur Allergentestung mit dieser Verfahrensvariante.

Beispiel 3: Bestimmung der freigesetzten Gerinnungs-  
hemmfaktoren

Bei diesem Test werden 0,1 ml mit Citrat ungerinnbar gemachtes Blut mit physiologischer, isotoner Kochsalzlösung auf das doppelte Volumen verdünnt. Das Allergen wird bei einem Testvolumen von 0,2 ml in isotoner Lösung zugesetzt, so daß sich insgesamt in den dickwandigen gedellten Objektträgern ein Volumen von 0,3 ml der verdünnten Blutsuspension befinden. Bei zahlreichen Testen auf viele unterschiedliche Allergene kann das Testvolumen auch auf die Hälfte reduziert werden, wobei dann 0,05 ml Blut mit 0,1 ml der Allergen-

Lösung versetzt werden. Das Gesamtvolumen dieses Testansatzes ist dann 0,15 ml. Die Inkubation erfolgt über 3 h in der feuchten Kammer bei 37°C. Zusatz von 0,1 ml einer Calciumlösung (0,045 molar), wie beschrieben. Mit dünnen Glasnadeln wird dann in kurzen Abständen durch diese Blutsuspension hindurchgekämmt. Nach 3 1/2 bis 4 min. zeigt sich in der Kontrolle eine normale Blutgerinnung daran, daß um die Glasnadeln sich die Fibrinfäden des geronnenen Blutes wickeln, bis schließlich die Glasnadel den gesamten Blutkuchen mitnimmt. In den noch nicht geronnenen Proben bzw. in den Proben, wo durch Allergeneinwirkung eine Gerinnungshemmung eintritt, kämmt die Glasnadel durch das Erythrozyten- und Leukozyten-Gemisch hindurch und hinterläßt allenfalls für kurze Zeit eine sich rasch verwaschende Spur. Mit einer Stoppuhr wird der Verlauf der Gerinnungsprozesse gemessen. Damit in mehreren Gerinnungsproben die Glasnadel gleichzeitig durchgeführt werden kann, wurde ein Kamm mit vorstehenden Zähnen, die den etwa geschilderten Glasnadeln entsprechen, (technisch hergestellt aus Glaskapillaren, wie zur Haematokritbestimmung) verwendet, jedoch am unteren Ende zugeschmolzen).

Der Gerinnungstest ist die technisch einfachste Verfahrensvariante, umfaßt ein sehr breites Spektrum der unterschiedlichsten Allergene und benötigt vor allem keine aufwendigen Apparaturen, wie z.B. Photometer.